

**Die Aktivität der hormonproduzierenden
Zellen im Hypophysenvorderlappen
von Tupajas (Tupaia belangeri)
während einer einjährigen Eingewöhnungszeit
und nach viertägigem sozialen Dauerstreß**

Hans Kolb

1978

DIE AKTIVITÄT DER HORMONPRODUZIERENDEN ZELLEN IM
HYPOPHYSENVORDERLAPPEN VON TUPAJAS (*Tupaia belangeri*)
WÄHREND EINER EINJÄHRIGEN EINGEWÖHNUNGSZEIT UND NACH
VIERTÄGIGEM SOZIALEN DAUERSTRESS

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DES FACHBEREICHES BIOLOGIE DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON

HANS KOLB

AUS BRUCKMÜHL

MÜNCHEN 1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Autrum

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bohn

Tag der mündlichen Prüfung: 28.9.1978

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	1
B. MATERIAL UND METHODEN	
I. Versuchstiere	
1. Tupajas.....	3
2. Kaninchen.....	3
II. Versuchsbedingungen	
1. Eingewöhnungstiere.....	3
2. Kampftiere.....	4
III. Töten der Tiere.....	4
IV. Verwendete Abkürzungen.....	4
V. Methoden	
1. Verwendete Substanzen.....	5
2. Aufarbeitungsgang.....	6
a. Fixieren der Hypophyse.....	6
b. Herstellung der Antiseren gegen die Hypo- physenvorderlappenhormone.....	7
c. Präparation des Fluoreszenzserums (Fluoro- chromierung).....	8
d. Immunhistologische Darstellung.....	9
e. Spezifitätskontrollen.....	10
f. Auswertung der Schnitte.....	11
C. ERGEBNISSE	
I. Allgemeine Morphologie der Hypophyse.....	12
II. Veränderungen der hormonproduzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens	
1. Während einer einjährigen Eingewöhnungszeit.....	13
2. Nach viertägigem soziopsychischen Dauerstress...	14

D. DISKUSSION

I. Spezifität der Methode.....	16
II. Aktivitätsindex als Maß für die Zellaktivität....	16
III. Aktivität der Hypophysenvorderlappenzellen und ihre Beziehung zu peripheren Parametern.....	19

E. SCHEMATA, TABELLEN UND ABBILDUNGEN..... 24

F. ZUSAMMENFASSUNG..... 36

G. LITERATUR..... 38

A. EINLEITUNG

Wird ein Organismus einer Belastung ausgesetzt, so reagiert er nicht nur mit reizspezifischen, sondern auch mit einer Anzahl von unspezifischen Reaktionen. Diese sollen die allgemeine Widerstandsfähigkeit des Organismus erhöhen; sie werden nach SELYE (1950) als das "allgemeine Anpassungssyndrom" bezeichnet. An diesen Anpassungsreaktionen sind die verschiedensten endokrinen Organe beteiligt.

Von besonderer Bedeutung für die Anpassung eines Organismus an seine Umwelt ist die Hypophyse, da sie durch ihre glandotropen Hormone indirekt sowie über STH auch direkt auf nahezu alle hormongesteuerten Prozesse einwirkt. Die Kenntnis der Aktivität der Hypophyse - besonders ihres Vorderlappens - ist daher eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis von Anpassungsreaktionen. Diese Kenntnis ist jedoch heute vor allem aus methodischen Gründen noch höchst unvollkommen. Zwar sind heute nahezu alle Hypophysenvorderlappenhormone im Blut bestimmbar; da sie jedoch auf jeden Reiz (z.B. Blutentnahme) innerhalb von kurzer Zeit abgegeben werden können (Dallman et al., 1972), ist eine Erfassung von Basalwerten und von Veränderungen bei Belastung durch die Bestimmung ihrer Konzentrationen nur sehr schwer möglich.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, aufgrund morphologischer Veränderungen der Hypophysenzellen Rückschlüsse auf ihren Funktionszustand zu ziehen. Da sich derartige morphologische Parameter nicht so schnell bei störenden Einwirkungen verändern, könnten sie einen besseren Index für die Aktivität der verschiedenen hypophysären Systeme darstellen als die Bestimmung der Hormonkonzentrationen. Voraussetzung für diese morphometrische Methode ist jedoch, daß die einzelnen hormonproduzierenden Zellen in der Hypophyse identifiziert werden können. Dies wurde zwar bereits 1931 von KIRKMAN versucht, aber erst durch die Einführung der Perjodsäure-Technik war es möglich, im Hypophysenvorderlappen sieben unterschiedliche Zelltypen darzustellen, die die verschiedenen Hormone produzieren sollten

(Zusammenfassung: Kracht et al., 1967). Bei dieser Methode erscheinen die jeweiligen Zelltypen in Farben, die sich zum Teil nur durch Nuancen (z.B. rotviolett, blauviolett) unterscheiden. Hierdurch wird es jedoch - wie bei vielen histochemischen Methoden - unmöglich, im eigentlichen Sinn objektive, vom Beobachter unabhängige Reaktionsstärken zu messen (Arnold und Klessen, 1975). Deshalb sind die histochemisch-histologischen Methoden zu ungenau, um eine exakte Lokalisation und Unterscheidung der verschiedenen Hypophysenvorderlappenhormone zu ermöglichen.

Dies war erst durch die Einführung immunologischer Methoden möglich. Das Prinzip der Immunhistologie besteht darin, die Verteilung einer Substanz im Gewebe durch Reaktionen mit gegen diese Substanz gerichteten Antikörpern sichtbar zu machen. Die Antikörper werden zu diesem Zweck mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Auf diese Weise konnten die mit histochemischen Methoden erhaltenen Zelltypen den jeweiligen Hormonen zugeordnet werden (Zusammenfassung: Kracht et al., 1967; Weidner, 1972). Nachdem die Zelltypen lokalisiert waren, konnten auch deren Veränderungen (z.B. in der Kerngröße) unter normalen periodischen Prozessen (Reproduktionszyklus: Anderson et al., 1972; Jahresperiodik: Perret, 1975) sowie unter pathologischen Bedingungen (Cushing syndrome: McCullagh, 1962) nachgewiesen werden. Insgesamt wurden aber weder systematische Untersuchungen über die Beziehung zwischen Morphologie der Hypophysenzellen und ihrer Aktivität durchgeführt, noch wurde die Funktion der verschiedenen Zelltypen bei Anpassungsreaktionen erfaßt.

Die vorliegende Arbeit ist Teil unserer Untersuchungen über sozialen Stress bei Tupajas. Sie hatte folgende Ziele:

1. Die Zelltypen zu lokalisieren, die die verschiedenen Hormone im Hypophysenvorderlappen von Tupajas produzieren.
2. Eine Methode zu erarbeiten, um aufgrund histologischer Befunde funktionelle Aussagen zu treffen.
3. Die Veränderungen der Hypophysenaktivität in bestimmten Situationen zu erfassen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Versuchstiere

1. Tupajas

Es wurden männliche Tupaja belangeri untersucht, die als adulte Tiere in Thailand gefangen und direkt an uns geschickt worden waren. Sie wurden im Institut in Holzkäfigen (100 cm x 50 cm x 50 cm) gehalten. Boden und Vorderwand der Käfige waren aus Drahtgitter. Futterpellets (Tupaja-Diät: Altromin) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere hatten einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden; die Hellphase dauerte von 10°° - 22°° Uhr. Die Raumtemperatur betrug 22 - 24° C.

2. Kaninchen

Die Kaninchen waren Stallkaninchen beiderlei Geschlechts. Sie wurden im Institut in Stahlkäfigen der Firma ALTROMIN gehalten. Futterpellets (Standarddiät: Altromin) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere hatten einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden; die Hellphase dauerte von 8°° - 20°° Uhr. Die Raumtemperatur betrug 20 - 22° C.

II. Versuchsbedingungen

1. Eingewöhnungstiere

Jeweils 10 Tiere wurden am 1. Tag nach ihrer Ankunft, 10 weitere nach 28 Tagen, 10 nach 70 Tagen und 9 nach 118 Tagen getötet. Außerdem wurden 6 Tiere untersucht, die länger als 1 Jahr im Institut unter konstanten Bedingungen gehalten worden waren. Diese werden im folgenden als "Kontrolltiere" bezeichnet.

2. Kampftiere

10 männliche adulte Tupajas, die länger als ein Jahr im Institut gehalten worden waren, wurden jeweils einzeln in 14-tägigem Abstand zu einem kampfprobenen Männchen ("Kämpfer") in dessen Käfig (100 cm x 100 cm x 60 cm) gesetzt. Sie wurden vom Kämpfer sofort attackiert und in weniger als 3 Minuten unterworfen. Beide Tiere wurden dann durch ein Gitter voneinander getrennt, so daß das unterlegene Tier seinen Sieger andauernd sehen, aber von ihm nicht angegriffen werden konnte. Alle 1 - 2 Tage wurden Kampf und Unterwerfung wiederholt. Dieser andauernde Anblick des siegreichen Artgenossen stellt für das unterlegene Tier eine extreme Belastung dar und führt innerhalb weniger Tage zum Tod (Einzelheiten: v. Holst, 1972).

Am 4. Tag nach der ersten Unterwerfung wurden die unterlegenen Tiere getötet.

III. Töten der Tiere

Alle Tupajas wurden um 8⁰⁰ Uhr durch einen Schnitt durch die linke Carotis getötet. Das aufgefangene Blut wurde möglichst schnell abzentrifugiert und das Serum bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Anschließend wurden folgende Organe herauspräpariert und - bis auf die Hypophyse - gewogen: Hypophyse, Analdrüsen, Prostata, Samenblasen, Nebennieren, Nebenhoden, Hoden, Milz, Nieren, Herz. Folgende Hormonkonzentrationen wurden unter anderem im Serum bestimmt: Corticoide, Thyroxin¹, Testosteron².

IV. Verwendete Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
LH	Luteinisierendes Hormon = ICSH (interstitielle Zellen stimulierendes Hormon)

¹ Der Corticoidgehalt und die Thyroxinkonzentration im Serum wurden radioimmunologisch im Labor von Prof. v. Holst bestimmt.

² Die Testosteronkonzentration wurde im Labor von Prof. Hoffmann in Weihenstephan (Freising) bestimmt.

PBS	Physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
STH	Somatotropes Hormon
TSH	Schilddrüsenstimulierendes Hormon

V. Methoden

1. Verwendete Substanzen

ACTH

Synacthen: Pharmazeutika CIBA-GEIGY, Wehr/Baden³

LH

NIH-LH-S 18: National Institute of Health; Bethesda, Maryland⁴

STH

Somacton: Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel

TSH

Thyreostimulin: Organon GmbH

Anti-Kaninchen- γ -Globulin

Anti-Kaninchen- γ -Globulin: Behring (RET 04), unmarkiert und FITC-markiert: Behringwerke AG, Marburg/Lahn

FITC

Calbiochem, San Diego, Californien 92112

Freund'sches Adjuvans

Difco Laboratories, Detroit, 1 Michigan

³Der CIBA AG danke ich für die Überlassung von 5 mg SYNACTHEN

⁴Dem National Institute of Health danke ich für die Überlassung von 2 g LH

Sephadex

Carl Roth oHG, 75 Karlsruhe-West

Alle anderen Chemikalien hatten p.A.-Qualität und stammten von der Firma Merck AG, Darmstadt.

2. Aufarbeitungsgang

Die immunhistologische Darstellung der Hypophysenvorderlappenzellen erfolgte indirekt auf folgende Weise (Einzelheiten siehe unten und Schema 1):

- Die Hypophyse wird fixiert, eingebettet und geschnitten.
- Auf die Schnitte eines jeden Objektträgers wird ein Antiserum vom Kaninchen gebracht, das Antikörper gegen jeweils eines der verschiedenen Hypophysenvorderlappenhormone enthält (nicht fluoreszierender Antikörper-Hormon-Komplex).
- Die Schnitte werden mit einem Antiserum von der Ziege inkubiert, das Antikörper gegen Kaninchenserum enthält. Dieses ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dadurch erhält man einen fluoreszierenden Komplex (Antiserum-Kaninchen/Antiserum-Ziege).
- Die Schnitte werden photographiert und ausgewertet.

a. Fixieren der Hypophyse

Die Hypophysen wurden möglichst rasch (in weniger als fünf Minuten nach dem Töten) fixiert. Die Fixierung geschah mit Elftmans Formol-sublimat (Elftman, 1957). Nach 24 Stunden Fixierung wurden die Hypophysen 48 Stunden in fließendem Leitungswasser gewaschen, dehydriert und in Paraplast eingebettet. Von den Hypophysen von jeweils 5 Tieren pro Gruppe wurden zu einem späteren Zeitpunkt Serien von 5 μ dicken

dorsoventralen Schnitten angefertigt und die einzelnen Schnitte fortlaufend auf 6 Objektträger aufgebracht. Auf jedem Objektträger befanden sich 10 - 15 Schnitte, die jeweils $6 \times 5\mu$ ($= 30\mu$) Abstand voneinander hatten. Jeder dieser 6 Objektträger wurde dann mit einem anderen Antiserum behandelt.

b. Herstellung der Antiseren gegen die Hypophysenvorderlappenhormone

Zur Immunisierung der Kaninchen wurden folgende Antigene verwendet:

ACTH: synthetisches ACTH (β^{1-24} Corticotropin)

LH: aus Schafshypophysen gewonnenes LH

STH: aus Schweinehypophysen gewonnenes STH

TSH: aus Rinderhypophysen gewonnenes TSH

Die Reinheit der verschiedenen, zur Antikörpergewinnung verwendeten Hypophysenvorderlappenhormone wurde jeweils durch den Ouchterlony-Test überprüft.

Das TSH war durch LH verunreinigt. Um dieses LH zu entfernen, wurde das Thyreostimulin mit LH-Antiserum (= Antikörper) im Verhältnis 2:1 vermischt und für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats wurde der Überstand nochmals für 24 Stunden mit Anti-LH (Verhältnis 4:1) bei 4°C inkubiert. Nach nochmaligem Abzentrifugieren enthielt der Überstand keine erkennbaren LH-Mengen mehr (Ouchterlony-Test). Das so aufgereinigte Thyreostimulin wurde zur Antikörperherstellung verwendet.

Von diesen Hypophysenvorderlappenhormonen (= Antigene) wurden jeweils 50 I.E. ACTH, bzw. 10 mg LH, STH oder TSH in 0,5 ml Aqua bidest. gelöst. Jedes Hormon wurde dann in 1,5 ml kompletten Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die in diesem Adjuvans enthaltenen abgetöteten Tuberkelbazillen bewirken, daß in den Kaninchen eine erhöhte und beschleunigte Immunreaktion hervorgerufen wird. Die Emulsion von jeweils einem Hormon und Adjuvans wurde einem Kaninchen subcutan an verschiedenen Stellen injiziert, um eine möglichst gute Wirkung zu erzielen.

Den Kaninchen wurde wöchentlich aus der Ohrvene Blut entnommen und mit der Mikromethode der Gelddiffusion nach Ouchterlony auf präzipitierende

Antikörper untersucht. 10 - 16 Wochen nach der ersten Injektion hatten alle Kaninchen eine hohe Antikörperkonzentration. Daraufhin wurden die Tiere getötet, das Blut aufgefangen und abzentrifugiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Serum bei -20°C aufbewahrt. Alle Antikörper präzipitierten nur mit dem Antigen, gegen das sie gerichtet waren.

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen und damit zur Abschwächung unspezifischer Fluoreszenz (siehe Spezifitätskontrollen) war es notwendig, die γ -Globulinfraction dieser Antiseren herzustellen. Die γ -Globuline wurden nach der Methode von CAMPBELL et al. (1964) mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Das Ammoniumsulfat wurde anschließend über einer Sephadex G-50 fine Säule (2,5 x 40 cm) abgetrennt. Die gereinigten γ -Globuline wurden gefriergetrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Für die Untersuchungen wurde das Lyophilisat in Aqua bidest. aufgelöst und auf die Schnitte gebracht.

c. Präparation des Fluoreszenzserums (Fluorochromierung)

Die Markierung des Anti-Kaninchen- γ -Globulins mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) erfolgte nach RINDERKNECHT (1962) und GOLDSTEIN et al. (1961) (siehe Schema 2):

Anti-Kaninchen- γ -Globulin der Behringwerke AG (RET 04) wurde mit Carbonat-Bicarbonat-Puffer ($\text{pH} = 9,0$) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Diese Lösung wurde mit 8 mg FITC (10%ig an Celite adsorbiert) pro 100 mg Protein vermischt und zwei Stunden bei 4°C gerührt. Das freigesetzte Absorbat wurde anschließend abzentrifugiert und der überschüssige Farbstoff säulenchromatographisch (Sephadex-G 50 fine, equilibriert mit Phosphatpuffer 0,01 m, $\text{pH} = 7,1$) vom FITC-Proteinkonjugat abgetrennt.

Die Auftrennung des FITC-Proteinkomplexes geschah nach GOLDSTEIN et al. (1961, 1962) und DEDMON et al. (1965). Das FITC-Konjugat wurde mit einer Anionenaustauschersäule (Sephadex-A 50; 1,5 x 25 cm) aufgetrennt.

Eine Dialyse des Konjugats war nicht notwendig, da schon vorher auf der Säule der Carbonatpuffer gegen den Phosphatpuffer ausgetauscht worden war. Zunächst wurden die ungekoppelten bzw. unterkoppelten Proteine durch reinen Phosphatpuffer ohne NaCl-Zusatz eluiert. Durch eine Salzkonzentration von 0,14 m NaCl in 0,01 m Phosphatpuffer (pH = 7,5) wurden die optimal gekoppelten Proteine erhalten; bei einer Salzkonzentration von 0,02 n NaCl wurden die überkoppelten Proteine eluiert. Anschließend wurden die Seren gefriergetrocknet und bei - 20° C aufbewahrt.

Im Handel erhältliches, lyophilisiertes FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin von der Ziege (RET 04, Behringwerke, Marburg) bewirkte auf den Schnitten unspezifische Reaktionen. Deshalb wurde es auf die gleiche Weise aufgereinigt, wie das von uns markierte Anti-Kaninchen- γ -Globulin.

d. Immunhistologische Darstellung

Die Lokalisation der Hormone in der Hypophyse erfolgte indirekt. Hierbei wird die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper durch ein gegen letzteren gerichtetes Antiserum sichtbar gemacht.

Die entparaffinierten Schnitte wurden rehydriert und 5 Minuten in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS: pH = 7,4) gespült. Anschließend wurden sie mit dem Antikörper beschichtet und in einer feuchten Kammer 12 - 15 Stunden bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in PBS gespült und bei Zimmertemperatur 45 Minuten mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen- γ -Globulin inkubiert. Nach 3 x 10-minütigem Spülen mit PBS wurden die Schnitte mit einem Gemisch aus zwei Teilen Phosphatpuffer und acht Teilen Glycerin (pH = 7,4) eingedeckt.

Normalerweise wurde jeder Schnitt mit dem Antiserum- γ -Globulin und dem FITC-markierten Anti-Kaninchen- γ -Globulin beschichtet und die Fluoreszenz der spezifischen Zellen festgestellt. Mit dem Antikörper wurden

auf den Schnitten nur die Zellen bzw. Zellpopulationen angefärbt, die das Hypophysenvorderlappenhormon enthielten, gegen das der Antikörper gerichtet war. Hierbei färbte sich nur das Cytoplasma der entsprechenden Zelle an, der Zellkern blieb dunkel.

e. Spezifitätskontrollen

Um zu überprüfen, ob eine entsprechende Fluoreszenz auch durch unspezifische Reaktionen bewirkt werden könnte, wurden für die LH-Zellen folgende Spezifitätskontrollen entwickelt und durchgeführt:

- Schnitte + Anti-LH-Vollserum + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin;
- Schnitte + FITC-markiertes Anti-LH- γ -Globulin (direktes Verfahren);
- Schnitte + Vollserum vom Kaninchen + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin;
- Schnitte + γ -Globulinfraktion vom Kaninchen + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin;
- Schnitte + Anti-LH-Vollserum + Anti-Kaninchen- γ -Globulin + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin (blocking test);
- Schnitte + Anti-LH- γ -Globulin + Anti-Kaninchen- γ -Globulin + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin (blocking test);
- Schnitte + Vollserum vom Kaninchen + Anti-Kaninchen- γ -Globulin + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin;
- Schnitte + γ -Globulinfraktion vom Kaninchen + Anti-Kaninchen- γ -Globulin + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin;
- Schnitte + FITC-markiertes Anti-Kaninchen- γ -Globulin.

Nur bei den ersten beiden Versuchen trat eine Fluoreszenz auf, in allen übrigen Fällen gab es keine Reaktion. Bei einer Reaktion der Schnitte mit Anti-LH-Vollserum trat eine wesentlich stärkere unspezifische Fluoreszenz auf als bei nur mit der γ -Globulinfraktion inkubierten Schnitten. Es wurde daher für die Untersuchungen nur die γ -Globulinfraktion der jeweiligen Antiseren verwendet.

f. Auswertung der Schnitte

Um die Aktivität einer Zelle durch morphologische Parameter zu erfassen, wird im allgemeinen der Kerndurchmesser bestimmt (Berendes, 1965; Perret, 1975). Diese Methode ist aber nur dann sinnvoll, wenn alle Zellen etwa dieselbe Größe haben (Einzelheiten s.S. 17/18). In unserem Fall aber unterschieden sich die Zellen in den Hypophysen der verschiedenen Tiere - unabhängig von den Versuchsbedingungen - in ihrer Größe wie 1:2. Deshalb wurde der prozentuale Anteil des Kerns pro Zelle gemessen. Auf einem Objektträger wurden jeweils 3 Schnitte photographiert⁵ und die 10 größten, klar erkennbaren Zellen ausgewertet. Von diesen wurde die "Zellfläche" und die "Kernfläche" bestimmt. Als "Fläche" wurde ein Rechteck eingesetzt, dessen Seiten aus zwei zueinander senkrecht stehenden Zell- bzw. Kerndurchmessern bestanden. Die so berechneten "Flächen" waren dadurch größer als die wirklichen Flächen von Zelle und Kern. Diese Vereinfachung war jedoch möglich, da hier nur der prozentuale Anteil des Kerns interessierte und nicht die absolute Kern- bzw. Zellgröße. Aus diesen Zell- und Kernflächen wurde der prozentuale Anteil des Kerns berechnet. Auf diese Weise erhielt man also von jedem Tier für jede Zellpopulation, die ein bestimmtes Hypophysenvorderlappenhormon bildet, jeweils 30 Werte; das Mittel aus diesen wurde in der Untersuchung als Grundlage für Aktivitätsberechnungen verwendet, stets angegeben mit seinem mittleren Fehler. Die so bestimmten Mittelwerte werden im folgenden als "Aktivitätsindices" bezeichnet. Unterschiede wurden stets mit dem Student's t-Test auf ihre Signifikanz hin untersucht.

⁵ Mikroskop: Ultraphot III und Photomikroskop der Firma Zeiss mit Auflichtfluoreszenz; UV-Erregerfilter: Schott UG 1 (1 mm); Rotdämpfungsfilter: Schott BG 38 (4 mm); UV-Sperrfilter: Schott K 430; Filmmaterial: Kodak Ektachrome high speed (24 DIN).

C. ERGEBNISSE

I. Allgemeine Morphologie der Hypophyse

Die Hypophysen der einzelnen Tiere sind - unabhängig von den Versuchsbedingungen - unterschiedlich groß. Das Gewicht der Hypophysen konnte allerdings nicht bestimmt werden, da sie möglichst schnell fixiert werden mußten und daher nur grob von anhaftendem Bindegewebe freipräpariert wurden.

Nach den histologischen Untersuchungen besteht die Hypophyse von Tupajas aus einem großen Vorderlappen (HVL), einem kleineren Hinterlappen (HHL) und einem sehr kleinen Zwischenlappen (Pars intermedia). Das Verhältnis von Hypophysenvorderlappen zu Hypophysenhinterlappen ist je nach Individuum unterschiedlich groß; der Hypophysenhinterlappen kann 20 - 40 % der gesamten Hypophyse betragen.

Die Größe aller Zellen des Hypophysenvorderlappens ist bei den einzelnen Tieren relativ konstant, variiert jedoch von Tier zu Tier ganz beträchtlich (Maximum: 1:2; Tab. 1). Diese Unterschiede sind nicht auf funktionelle Unterschiede der Zellen bzw. auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen.

Im Hypophysenvorderlappen von Tupajas zeigt sich folgende Verteilung der einzelnen Hormone produzierenden Zelltypen:

ACTH-Zellen kommen gehäuft in der Nähe des Hypophysenzwischenlappens vor, sind aber auch über den restlichen Hypophysenvorderlappen verstreut; sie sind im allgemeinen rund bis oval. Dies entspricht den Befunden von anderen Tierarten (Mensch: Kracht et al., 1967; Ratte: Breustedt, 1968).

TSH-Zellen liegen einzeln über den ganzen Hypophysenvorderlappen verstreut; ebenso wie die ACTH-Zellen sind sie rund bis oval. Dies entspricht den Befunden von anderen Tieren (Ratte: Farquar und Rinehart, 1954; Beagle-Hündin: El Etreby et al., 1975).

LH-Zellen liegen gewöhnlich in Gruppen am Rande des Hypophysenvorderlappens; sie haben eine polygonale bis ovale Form. Dies entspricht den Untersuchungen an anderen Tierarten (Kaninchen: Allanson et al., 1966; Schwein: Mirecka und Pearse, 1971; Beagle-Hündin: El Etreby et al., 1975).

STH-Zellen machen den größten Teil der Hypophysenvorderlappenzellen aus. Sie liegen einzeln, sind teilweise aber auch in Ketten angeordnet; ihre Form ist unregelmäßig: rund, oval, dreieckig oder tropfenförmig. Dies entspricht den Untersuchungen an anderen Tieren (Zusammenfassung: Weidner, 1972).

II. Veränderungen der hormonproduzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens

1. Während einer einjährigen Eingewöhnungszeit

ACTH-produzierende Zellen

Der Aktivitätsindex der ACTH-produzierenden Zellen im Hypophysenvorderlappen ist am 1. und 28. Tag nach der Ankunft der Tiere weitgehend gleich. Nach 70 Tagen ist er signifikant ($p < 0,001$) niedriger und bleibt dann konstant (Abb. 1). Aktivitätsindex der ACTH-produzierenden Zellen und Nebennierengewicht sind positiv miteinander korreliert (Tab. 2). Je aktiver also die ACTH-produzierenden Zellen der Tiere sein dürften, desto schwerer sind auch ihre Nebennieren. Die Corticoidkonzentrationen im Blut der Tiere sind ebenfalls sehr eng mit den Aktivitätsindices korreliert (Tab. 2), doch wider Erwarten negativ: Je höher also wahrscheinlich die ACTH-Produktion ist, desto geringer ist die Konzentration der Corticoide im Blut.

TSH-produzierende Zellen

Der Aktivitätsindex der TSH-produzierenden Zellen nimmt im Verlauf der Eingewöhnungszeit kontinuierlich ab und erreicht erst nach einem Jahr seinen tiefsten Punkt (Abb. 2). Es besteht eine enge negative

Korrelation zwischen dem Aktivitätsindex der TSH-produzierenden Zellen und der Thyroxin-Konzentration im Blut der Tiere (Tab. 2). Offenbar nimmt also die TSH-Produktion während der Eingewöhnungsphase ab, während die Thyroxin-Konzentration im Blut ansteigt.

LH-produzierende Zellen

Der Aktivitätsindex der LH-produzierenden Zellen nimmt während der Eingewöhnungszeit zu, erreicht nach 112 Tagen seine maximale Höhe und bleibt dann konstant (Abb. 3). Die Hodengewichte sowie die Androgenkonzentrationen im Blut der Tiere sind mit dem Aktivitätsindex eng positiv korreliert (Tab. 2). Auch das Gewicht der Nebenhoden hat eine positive Beziehung zur Aktivität der LH-produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens ($r = 0,96$). Ebenso positiv korreliert ist der LH-Index mit dem Gewicht aller androgenabhängigen Organe (Prostata: $r = 0,73$; Samenblasen: $r = 0,73$; Analdrüsen: $r = 0,70$).

STH-produzierende Zellen

Der Aktivitätsindex der STH-produzierenden Zellen bleibt bis auf den Aktivitätsindex nach 28 Tagen während der Eingewöhnungsphase weitgehend konstant (Abb. 4); am 28. Tag ist er beträchtlich erhöht ($p < 0,001$). Außer mit dem Gewicht der Milz ist der Aktivitätsindex der STH-produzierenden Zellen mit keinem der bestimmten Parametern korreliert (Tab. 2). Worauf diese Korrelation zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden.

2. Nach viertägigem soziopsychischen Dauerstress

Werden Tiere soziopsychischem Dauerstress, d.h. dem andauernden Anblick eines überlegenen Artgenossen, ausgesetzt, so sterben sie innerhalb von 2 - 16 Tagen (v. Holst, 1972).

Der Aktivitätsindex der ACTH-produzierenden Zellen ist bei den Tieren nach 4 Tagen um fast 60 % höher als bei Kontrolltieren. Ebenso ist auch das Nebennierengewicht um ca. 30 % erhöht. Während jedoch die Corticoidkonzentration der Tiere bei ihrer Ankunft niedriger als

bei Kontrollen liegt, ist sie hier um nahezu 200 % höher als der Kontrollwert (Abb. 5). Kontrollwerte und Stresswerte sind signifikant voneinander verschieden ($p < 0,001$). Zwischen allen drei Parametern besteht eine enge positive Korrelation (Tab. 3).

Auch der Aktivitätsindex der TSH-produzierenden Zellen nimmt während der Belastung um ca. 70 % zu. Dagegen ist ebenso wie bei den Tupajas bei ihrer Ankunft die Thyroxinkonzentration im Blut der unterlegenen Tiere deutlich erniedrigt (ca. 40 % des Ausgangswertes; Abb. 5). Kontroll- und Stresswerte sind signifikant voneinander verschieden ($p < 0,001$). Es besteht eine negative Korrelation zwischen dem Aktivitätsindex und der Thyroxinkonzentration (Tab. 3).

Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Zelltypen nimmt der Aktivitätsindex der LH-produzierenden Zellen um ca. 20 % ab. Auch die Konzentration der Androgene im Blut der Tiere und das Gewicht beider Hoden sind 20 bzw. 70 % geringer als bei Kontrolltieren. Die Aktivitätsindices und die Androgenkonzentrationen sind signifikant voneinander verschieden ($p < 0,001$). Zwischen allen drei Parametern besteht eine positive Korrelation (Tab. 3).

Der Aktivitätsindex der STH-produzierenden Zellen nimmt geringfügig (5 %) zu (Abb. 5); der Anstieg ist jedoch nicht signifikant.

D. DISKUSSION

I. Spezifität der Methode

Durch die Anwendung der Immunofluoreszenztechnik war es möglich, im Hypophysenvorderlappen von Tupajas die Zellen zu lokalisieren, die die Hormone ACTH, TSH, LH und STH produzieren. Die beiden anderen Zelltypen - FSH-Zellen und Prolaktinzellen - zu identifizieren war nicht möglich, da diese Hormone zur Gewinnung von Antikörpern nicht erhalten werden konnten.

Zwar ist eine spezifische immunologische Kreuzreaktion der verwendeten Antiseren mit den entsprechenden Hormonen im Hypophysenvorderlappen der Tupajas nicht nachgewiesen, doch kann man sie voraussetzen, nachdem dies für eine Reihe anderer Tierarten belegt ist (Kracht et al., 1967; Breustedt, 1968; El Etreby et al., 1975; Perret, 1975). Die Anordnung der Zelltypen sowie ihre Form stimmte mit den Ergebnissen von anderen Tierarten überein (siehe Seite 12).

II. Aktivitätsindex als Maß für die Zellaktivität

Der "Aktivitätsindex" soll ein Maß für den Aktivierungszustand einer Zelle sein: Eine Zunahme des Aktivitätsindex kann dadurch auftreten, wenn das Kernvolumen zunimmt und das Zellvolumen sich nicht oder nur unwesentlich (im Verhältnis zum Kern) vergrößert bzw. wenn bei gleichbleibendem Kernvolumen das Zellvolumen abnimmt.

Eine Zunahme des Kernvolumens bei Aktivierung einer Zelle wird seit langer Zeit als Index für die Aktivität eines sezernierenden Organs verwendet. So hat LUDWIG schon 1950 in einem zusammenfassenden Artikel festgestellt, daß das Kernvolumen einen genauen und differenzierten Index für den Aktivitätsgrad der Schilddrüse darstellt. Aber nicht nur für die Schilddrüse, sondern auch für andere Organe wurde das Kernvolumen als Maß für die Aktivität angewendet.* Ebenso wurde bei Unter-

*Schilddrüse: Palkovits, 1963; Herrmann und Lautenschläger, 1968; Nebenniere: Herrmann und Lautenschläger, 1968; Stark et al., 1968; Malendowicz, 1972; Sharaway und Penney, 1977; Leber: Herrmann und Lautenschläger, 1968.

suchungen der Hypophyse die Zellgröße verwendet, um Aussagen über ihre Aktivität treffen zu können. So betrachtet SERVER (1961) Vergrößerungen der Zellkerne gonadotroper Zellen durch nukleare Einschlüsse in der Hypophyse von kastrierten Hamstern als Beweis für erhöhte Aktivität. Im Hypophysenvorderlappen von *Microcebus murinus* hat PERRET (1975) jahresperiodische Veränderungen der Kerndurchmesser bei den verschiedenen glandotrope Hormone bildenden Zellen gefunden. Außerdem waren damit Veränderungen der von diesen Hormonen gesteuerten Systeme verbunden.

Sezerniert eine Zelle, so nimmt das Zellvolumen ab. Die gegenwärtige Theorie des Ablaufs intrazellulärer Prozesse, die sich während der Sekretion ereignen, basiert größtenteils auf den Untersuchungen am Pankreas von Meerschweinchen (Zusammenfassung: Farquar, 1971). Durch Kombination von morphologischen und biochemischen Methoden wurde gezeigt, daß die Sekretion von Proteinen in folgenden Schritten abläuft: die Sekretionsprodukte werden an Ribosomen synthetisiert, die an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums gebunden sind. Sie werden anschließend durch diese Membranen in das Innere des endoplasmatischen Retikulums transportiert. Von dort werden sie von kleinen Vesikeln, die vom endoplasmatischen Retikulum abgetrennt werden, zu einer sich verdichtenden Vakuole in der Golgi-Region gebracht, wo die Konzentration der Sekretionsprodukte stattfindet. Das konzentrierte Produkt wird dann gespeichert und auf einen bestimmten Stimulus hin abgegeben, und zwar durch Exocytose oder durch Fusion der Granulamembran mit der Plasmamembran an der Zelloberfläche. Das Zellvolumen nimmt ab (Kanno, 1974). Durch eine solche Sekretion treten teilweise oder vollständig degranulierte Zellen auf: Bei Aktivierung einer Zelle dürfte also einerseits das Kernvolumen zunehmen, andererseits bei Sekretion das Zellvolumen abnehmen: In beiden Fällen würde also der Kern prozentual gegenüber der Zelle zunehmen, d.h. der Aktivitätsindex sollte ansteigen.

Der in dieser Arbeit verwendete prozentuale Anteil des Kerns pro Zelle kann aber nur dann sinnvoll als Index für die Aktivität einer Zelle

verwendet werden, wenn zwei Vorbedingungen erfüllt sind: 1. Die Zelle muß annähernd in der Mitte geschnitten werden. 2. Der Kern muß etwa im Zentrum der Zelle liegen.

Zu 1.: Liegt der Schnitt durch eine Zelle nicht etwa in ihrer Mitte, so kann eine Verfälschung auftreten, da an den Randbezirken der Zelle die Fläche des Kerns schneller abnimmt als die Zellfläche. In der vorliegenden Arbeit wurden daher nur die 10 größten Zellen eines Schnittes zur Auswertung herangezogen, da so die Wahrscheinlichkeit, daß der Zellmittelpunkt beim Schneiden getroffen wurde, am größten ist.

Zu 2.: Um festzustellen, ob der Kern ungefähr im Zentrum der Zelle liegt, wurde auf der Photographie eines Schnittes von allen Zellen bestimmt, inwieweit der Schnittpunkt der beiden senkrecht zueinander stehenden Kerndurchmesser vom Schnittpunkt der beiden senkrecht zueinander stehenden Zelldurchmesser entfernt war. Diese Entfernung wurde in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb. 6). Es zeigte sich, daß bei ca. 90 % aller Zellen diese beiden Schnittpunkte weniger als $1/4$ des mittleren Kerndurchmessers voneinander entfernt waren. Somit kann angenommen werden, daß in der Regel der Kern in der Mitte der Zelle liegt.

Das Verhältnis von Kern zu Zelle sollte man also als Maß für die Aktivität einer Zelle verwenden können. Auch dürfte der hier verwendete "Aktivitätsindex" insgesamt geeigneter sein, als der von anderen Autoren (Anderson et al., 1972; Perret, 1975) als Aktivitätsmaß verwendete Zellkerndurchmesser, da sich hiermit eine mögliche Abnahme des Zellvolumens durch sekretorische Prozesse nicht erfassen läßt.

Dieser Aktivitätsindex mag für die einzelne Zelle richtig sein, ob er allerdings auch als Maß für die Aktivität der gesamten Zellpopulation (bzw. der gesamten Hypophyse) gelten kann, ist ungeklärt, da sich die Gesamtzahl der ein bestimmtes Hormon bildenden Zellen im Hypophysenvorderlappen ändern könnte. So wurden beim Hund im Hypophysenvorderlappen sechs funktionell verschiedene Drüsenzelltypen und eine "Stamm-

zelle" gefunden, die nicht auf Antikörper gegen die verschiedenen Hypophysenvorderlappenhormone anspricht (El Etreby et al., 1975). Diese Zelle dürfte der von anderen Autoren als "interstitial cell" beschriebenen Zelle entsprechen (Zusammenfassung: Foster, 1971). Diese "interstitial cell" könnte entweder undifferenziert, inaktiv oder erschöpft sein. Es wäre denkbar, daß diese interstitiellen Zellen je nach Bedarf aktiv werden, wodurch sich die Zahl der ein bestimmtes Hormon bildenden Zellen (und damit die Hormonproduktion der Hypophyse insgesamt) verändern könnte, ohne daß die Aktivität der einzelnen Zelle verändert wäre. Gegen diese Annahme spricht allerdings die enge Beziehung des Aktivitätsindex mit den von ihm abhängigen peripheren Parametern (siehe auch Tab. 2 und 3).

III. Aktivität der Hypophysenvorderlappenzellen und ihre Beziehung zu peripheren Parametern

Die im Versuch verwendeten Tupajas waren Wildfänge aus Thailand. Gefangennahme, Transport und Eingewöhnung sind sicherlich eine starke, länger anhaltende Belastung. Entsprechend war auch das Körpergewicht der Tiere bei der Ankunft gering, das Gewicht ihrer Nebennieren groß, das der Hoden klein usw.. Im Verlauf der Eingewöhnung in unserem Labor nahmen die Körper- und Hodengewichte der Tupajas zu und ihre Nebennierengewichte ab - der Stresszustand verringerte sich also. Die einzelnen Gruppen (1, 28, 70, 112, 365 Tage) unterschieden sich zum Teil signifikant in allen untersuchten Parametern voneinander, obgleich innerhalb der einzelnen Gruppen auch Unterschiede vorhanden waren: Zum Beispiel variierten die Gewichte der Nebennieren einer Gruppe bis zu 1:1,7. Eine noch stärkere Belastung als Gefangennahme, Transport und Eingewöhnung ist für den Organismus der andauernde Anblick des siegreichen Artgenossen. Er führt zu so starken physiologischen Veränderungen, daß das unterlegene Tier innerhalb von 2 - 16 Tagen stirbt (Einzelheiten: v. Holst,

1972). Ebenso wie bei den Neuankömmlingen sind bei ihnen Körper- und Hodengewichte verringert und die Nebennierengewichte erhöht.

Bei den untersuchten Tieren sind Aktivitätsindex der ACTH-Zellen und Gewicht beider Nebennieren eng miteinander korreliert. Dies steht mit der Hypothese im Einklang, daß Belastungen eine erhöhte ACTH-Abgabe des Hypophysenvorderlappens und dadurch eine Vergrößerung der Nebennieren durch Hypertrophie und Hyperplasie hervorrufen (Zusammenfassung: Bajusz, 1969). Mit dieser Vergrößerung des Sekretionsgewebes sollte eine Steigerung der Abgabe von Corticoidhormonen und damit auch ein Anstieg der Corticoide im Blut der Tiere verbunden sein. Dies war aber nur bei den Tieren der Fall, die dem Kontakt des überlegenen Artgenossen ausgesetzt waren. Bei den Eingewöhnungstieren war hingegen das Corticoidniveau im Blut umso niedriger, je größer der Aktivitätsindex der ACTH-Zellen war. Ähnliches haben VESCEI und CASLAY (1965) bei der Laborratte gefunden: Bei einer mehrtägigen Belastung durch Kälte und chemische Gifte (Formalin) nimmt die Corticoidkonzentration im Blut ab, während sich das Gewicht der Nebennieren erhöht und diese histologisch-histochemisch alle Anzeichen starker sekretorischer Aktivität zeigen. Die Ursachen dieser Diskrepanz zwischen Aktivität der Nebenniere einerseits und Aktivität der ACTH-Zellen im Hypophysenvorderlappen andererseits ist ungeklärt: Die Gewichtszunahme der Nebennieren deutet - trotz des Absinkens der Corticoidkonzentration im Blut - darauf hin, daß die Hypophyse vermehrt ACTH abgibt. Die Synthese und/oder Abgabe von Corticoiden könnte jedoch durch einen unbekannten Mechanismus gehemmt sein. Für diese Annahme spricht der Befund von PACE et al. (1965), daß bei Soldaten die Nebennieren nach einer längeren schweren körperlichen und seelischen Belastung (Nahkampfeinsatz) über Tage hin verringert auf ACTH ansprachen. Erst 10 Tage nach der Belastung führte ACTH wieder zu einem normalen Corticoidanstieg im Blut. Ebenso fand WINKLER (1970) nach einer einmaligen ACTH-Injektion hoher Dosis beim Menschen über Tage hin eine verringerte Ausscheidung von Corticoiden im Harn. Diese Befunde erklären aber nicht, weshalb in

unserem Fall eine so enge negative Korrelation zwischen dem Aktivitätsindex der ACTH-Zellen und dem Corticoidniveau im Blut der Tiere über Monate hinweg bestand. Diese Frage muß daher offen bleiben.

Im Gegensatz zum Hypophysen-Nebennierenrindensystem zeigt das Hypophysen-Schilddrüsen-System nicht nur während der Eingewöhnungsphase, sondern auch unter soziopsychischer Dauerbelastung eine Diskrepanz zwischen dem Aktivitätsindex der Hypophysenzellen und der davon abhängigen Hormonkonzentration im Blut der Tiere. Bei Affen steigt die Schilddrüsenaktivität bei akuten und chronischen Belastungen der verschiedensten Art an, bei manchen Tierarten (vor allem Nagern) soll die Schilddrüsenfunktion bei Belastungen jedoch absinken (Zusammenfassung: Mason et al., 1961). Bei Wildratten, die ähnlichen Versuchsbedingungen wie unsere Tiere ausgesetzt waren, fanden EVANS und BARNETT (1965/66) Hinweise für eine erniedrigte Schilddrüsensekretion. Ob bei Tupajas die Hypophyse bei Belastung vermehrt TSH abgibt, wie es nach dem Aktivitätsindex zu erwarten wäre und die Schilddrüse ungenügend auf diese anhaltende Stimulation anspricht bzw. ob die Hormone bei Belastungen vermehrt in die Gewebe übertreten, kann durch unsere Befunde nicht geklärt werden. Die enge negative Korrelation zwischen dem Aktivitätsindex der TSH-Zellen und dem Thyroxingehalt im Blut deutet jedoch auf einen kausalen Zusammenhang hin.

Der Aktivitätsindex der LH-Zellen nimmt während der Eingewöhnungsphase kontinuierlich zu, bis er vom 112. Tage an etwa konstant bleibt. Dies deutet auf eine Steigerung der LH-Produktion hin. Durch LH wird die Produktion der Androgene stimuliert, deren Konzentration entsprechend auch im Blut zunimmt. Parallel dazu steigt auch das Gewicht der androgenabhängigen Organe an. Das Gewicht der Hoden hängt primär von der Größe der Samenkanälchen bzw. der adäquaten Stimulation von FSH und LH ab. Die Aktivität der FSH-Zellen konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestimmt werden; die Abgabe von FSH beruht aber ebenso wie die Abgabe von LH auf einem für beide gemeinsamen Releasing-Faktor (FSH/LH - releasing factor: Schally et al., 1971), dessen Sekretion durch die Sexualhormone im Blut auf einem bestimmten Niveau

einreguliert wird. Hierdurch kann die Korrelation des Aktivitätsindex mit dem Hoden- und Nebenhodengewicht erklärt werden. Während des soziopsychischen Dauerstress' nimmt der Aktivitätsindex der LH-Zellen, die Konzentration der Androgene und das Hodengewicht ab. Dies stimmt überein mit der Theorie, daß bei Belastungen die Gonadenfunktion als Folge einer verminderten Gonadotropinsekretion abnimmt.

Während der Eingewöhnungsphase zeigen die STH-Zellen nach 28 Tagen einen Aktivitätsanstieg. Dieser Befund ist unverständlich. Der Anstieg des Aktivitätsindex bei einer soziopsychischen Belastung deutet auf eine vermehrte Abgabe von STH bei Belastung hin. Die Funktion von STH bei Belastung ist noch weitgehend ungeklärt.

Die Veränderung der Aktivitätsindices der die einzelnen Hormone produzierenden Zellen entspricht weitgehend dem Anpassungskonzept. Bei Belastungen (Ankunft - soziopsychischer Dauerstress) treten hohe Aktivitätsindices bei den ACTH-Zellen und den TSH-Zellen auf und niedrige bei den LH-Zellen. Der Aktivitätsindex der STH-Zellen bleibt weitgehend unverändert, wobei allerdings unklar ist, ob geringe Veränderungen nicht bereits starke physiologische Auswirkungen haben. Die Aktivitätsindices der ACTH-Zellen und der TSH-Zellen sind miteinander eng positiv korreliert ($r = + 0,69$), d.h. je stärker ein Organismus belastet wird, desto stärker sind auch seine stoffwechselstimulierenden Systeme aktiviert. Dementsprechend besteht eine negative Korrelation der beiden Aktivitätsindices mit dem Aktivitätsindex der LH-Zellen ($r = - 0,48$ bzw. $r = - 0,73$).

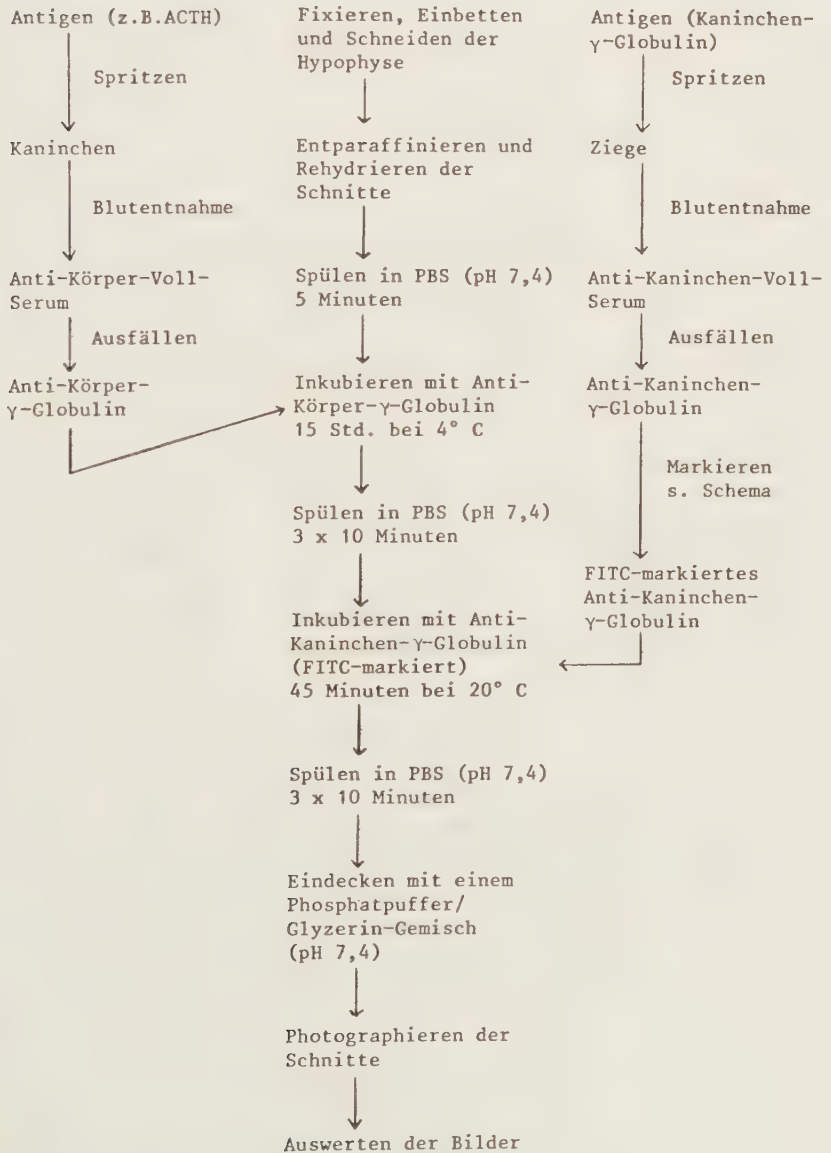
Interessanterweise reagieren die verschiedenen Systeme unterschiedlich schnell auf veränderte Umwelt: Bei der Eingewöhnung ist das ACTH-System relativ schnell auf seinem Kontrollwert, während das LH-System erst nach 3 Monaten seinen Kontrollwert erreicht hat. Das TSH-System hat selbst nach 112 Tagen noch nicht den Wert der Kontrolltiere erreicht. Werden Aussagen über den Anpassungszustand eines Tieres ge-

troffen, so wird üblicherweise allein die Corticoidkonzentration im Blut eines Tieres bestimmt. Die unterschiedlichen "Zeitverläufe" der einzelnen Systeme machen aber die Problematik solcher Aussagen deutlich.

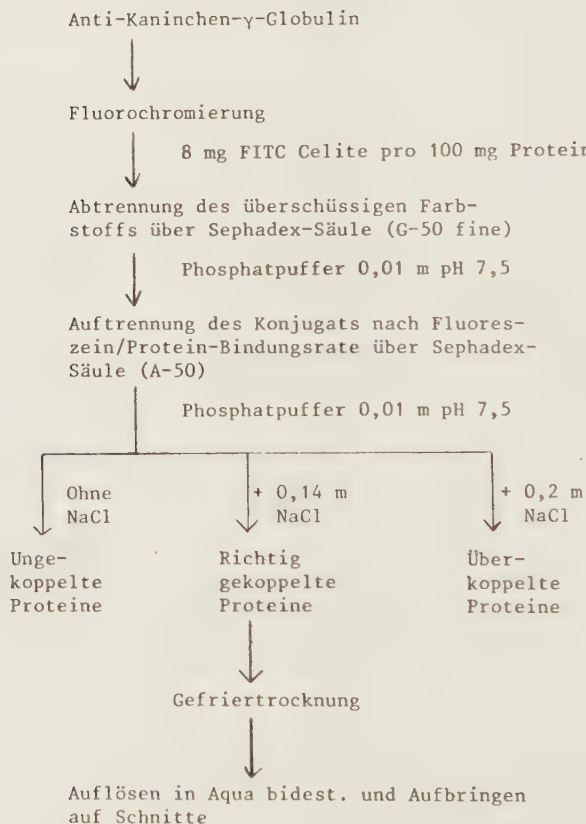
Insgesamt besteht eine enge Korrelation zwischen dem Aktivitätsindex der die einzelnen Hormone bildenden Zellen und den von diesen Hormonen abhängigen peripheren Parametern - und zwar nicht nur zwischen den unterschiedlichen Gruppen, sondern auch vielfach innerhalb der Gruppen. Obwohl bisher nicht geklärt ist, inwieweit der Aktivitätsindex tatsächlich auch ein quantitatives Maß für die Ausschüttung der Hypophysenvorderlappenhormone ist, deuten diese guten Korrelationen auf einen kausalen Zusammenhang hin. Im Gegensatz zu der Konzentration der Hypophysenhormone im Blut, die auf jede Störung (z.B. bei Blutentnahme oder Töten der Tiere) schnell anspricht, ändert sich der Aktivitätsindex nur sehr langsam. Er ist daher wahrscheinlich besser als jede direkte Hormonbestimmung geeignet, Aussagen über langfristige Anpassungsreaktionen von Säugern an Umweltveränderungen bzw. über ihren Anpassungszustand an eine bestimmte Situation zu treffen.

E. SCHEMATA, TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Schema 1. Immunhistologische Darstellung (indirektes Verfahren)



Schema 2. Präparation des Fluoreszenzserums



Versuchs- art	Tier Nr.	Mittlere Zell- größe (relat. Einheiten)	Versuchs- art	Tier Nr.	Mittlere Zell- größe (relat. Einheiten)
1. Tag	B 61	2,00 $\pm$ 0,12	112 Tage	B 2	2,53 $\pm$ 0,05
nach	B 62	1,88 $\pm$ 0,10	nach	B 35	2,69 $\pm$ 0,05
Ankunft	C 33	2,22 $\pm$ 0,05	Ankunft	B 36	3,07 $\pm$ 0,07
	C 34	2,37 $\pm$ 0,05		B 64	2,85 $\pm$ 0,06
	C 38	2,49 $\pm$ 0,15			
28 Tage	B 13	1,87 $\pm$ 0,05	Mehr als	H	2,52 $\pm$ 0,05
nach	B 21	2,36 $\pm$ 0,04	365 Tage	F 25	2,45 $\pm$ 0,05
Ankunft	B 23	1,98 $\pm$ 0,08	nach	F 30	2,33 $\pm$ 0,04
	E 24	1,76 $\pm$ 0,11	Ankunft	J 31	2,64 $\pm$ 0,05
	E 50	2,13 $\pm$ 0,04		J 35	2,41 $\pm$ 0,04
70 Tage	B 25	2,59 $\pm$ 0,05	Sozio-	16	3,48 $\pm$ 0,08
nach	B 26	2,77 $\pm$ 0,05	psychischer	C 36	2,52 $\pm$ 0,06
Ankunft	B 31	2,15 $\pm$ 0,07	Dauerstress	F 28	2,35 $\pm$ 0,05
	E 10	2,36 $\pm$ 0,12		F 29	2,64 $\pm$ 0,07
	E 49	1,82 $\pm$ 0,11		F 32	2,24 $\pm$ 0,05
				F 52	2,06 $\pm$ 0,04

Tab. 1. Relative mittlere "Größe (Fläche)" der Zellen im Hypophysenvorderlappen der Versuchstiere in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Versuchssituationen. Die mittlere Zellgröße jedes Tieres wurde aus den Mittelwerten der jeweils 4 ausgewerteten verschiedenen Zelltypen bestimmt. Die Mittelwerte sind mit ihrem mittleren Fehler angegeben.

Beziehungen der verschiedenen Parameter zueinander	Korrelation aus allen	
	Einzelwerten	Mittelwerten
ACTH-Zellen zu Corticoidniveau im Serum	r= -0,454 n= 22 p< 0,05	r= -0,908 n= 5 p< 0,02
ACTH-Zellen zu Gewicht beider Nebennieren	r= +0,827 n= 24 p< 0,001	r= +0,998 n= 5 p< 0,001
Corticoidniveau im Blut zu Gewicht beider Nebennieren	r= -0,329 n= 35 p< 0,1	r= -0,892 n= 5 p< 0,02
TSH-Zellen zu Thyroxinniveau im Serum	r= -0,667 n= 22 p< 0,001	r= -0,95 n= 5 p< 0,01
LH-Zellen zu Testosteronniveau im Serum	r= +0,745 n= 19 p< 0,001	r= +0,948 n= 5 p< 0,01
LH-Zellen zu Gewicht beider Hoden	r= +0,766 n= 24 p< 0,001	r= +0,873 n= 5 p< 0,01
Gewicht beider Hoden zu Testosteron-niveau im Serum	r= +0,489 n= 32 p< 0,01	r= +0,675 n= 5 p< 0,1
STH-Zellen zu Milz-gewicht	r= +0,501 n= 24 p< 0,01	r= +0,916 n= 5 p< 0,01

Tab. 2. Korrelationen verschiedener Parameter. Bei den Einzelwerten wurden die Einzelwerte aller Tiere zueinander in Beziehung gesetzt, bei den Mittelwerten wurden nur die Mittelwerte der jeweiligen Tage in Bezug zueinander gebracht. Die Aktivitätsindizes wurden nur mit den Werten der entsprechenden Tiere korreliert, deshalb erhielt man maximal 25 Korrelationen. In einigen Fällen waren jedoch nicht alle Werte vorhanden, deshalb war $n < 25$. In den übrigen Fällen wurden so viele Tiere wie möglich miteinander korreliert.

ACTH-Zellen zu Corticoidniveau im Serum	r= +0,891 n= 11 p< 0,001
ACTH-Zellen zu Gewicht beider Nebennieren	r= +0,692 n= 11 p< 0,05
Corticoidniveau im Serum zu Gewicht beider Nebennieren	r= +0,502 n= 12 p< 0,1
TSH-Zellen zu Thyroxinniveau im Serum	r= -0,882 n= 11 p< 0,001
LH-Zellen zu Testosteron- niveau im Serum	r= +0,683 n= 11 p< 0,02
LH-Zellen zu Gewicht beider Hoden	r= +0,445 n= 11 p< 0,1
Testosteronniveau im Serum zu Gewicht beider Hoden	r= +0,342 n= 12 p< 0,1

Tab. 3. Korrelationen zwischen Kontrolltieren und Tieren unter soziopsychischem Dauerstress. Es wurden die Einzelwerte aller Kontroll- und Stresstiere miteinander in Beziehung gesetzt. In einigen Fällen waren nicht alle Parameter von den Tieren vorhanden, die Zahl der Versuchstiere beträgt daher verschiedentlich nur n= 11.

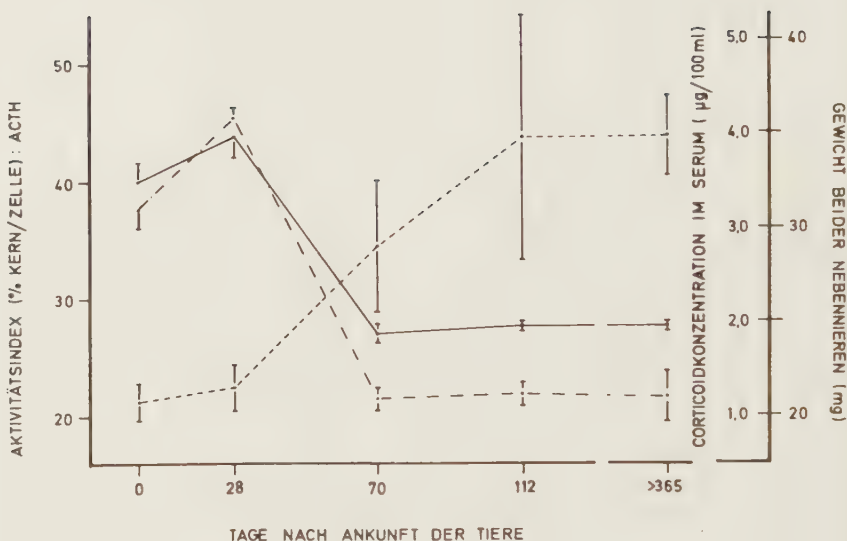


Abb. 1. Aktivität der ACTH-bildenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (—) männlicher Tupajas im Verlauf ihrer Eingewöhnung und ihre Beziehung zum Nebennierengewicht (----) und der Corticoidkonzentration (-·-·-) im Blut. Es sind stets die Mittelwerte mit ihren mittleren Fehlern angegeben. Aktivitätsindex: 150 Werte von 5 Tieren; die übrigen Werte stammen von jeweils 10 Tieren. Bei einigen Punkten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit der mittlere Fehler des Mittelwertes nur nach einer Seite eingezeichnet.

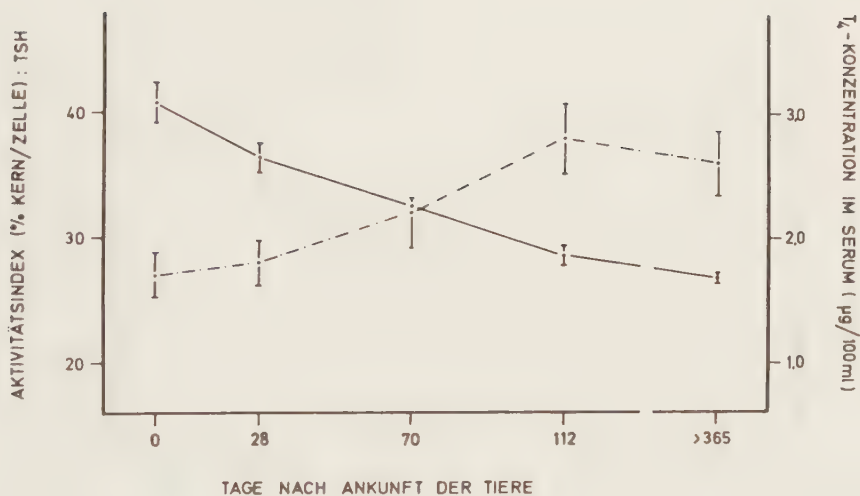


Abb. 2. Aktivität der TSH-bildenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (—) männlicher Tupajas im Verlauf ihrer Eingewöhnung und ihre Beziehung zur Thyroxin (T_4)-Konzentration (----) im Blut. Einzelheiten siehe Abb. 1.

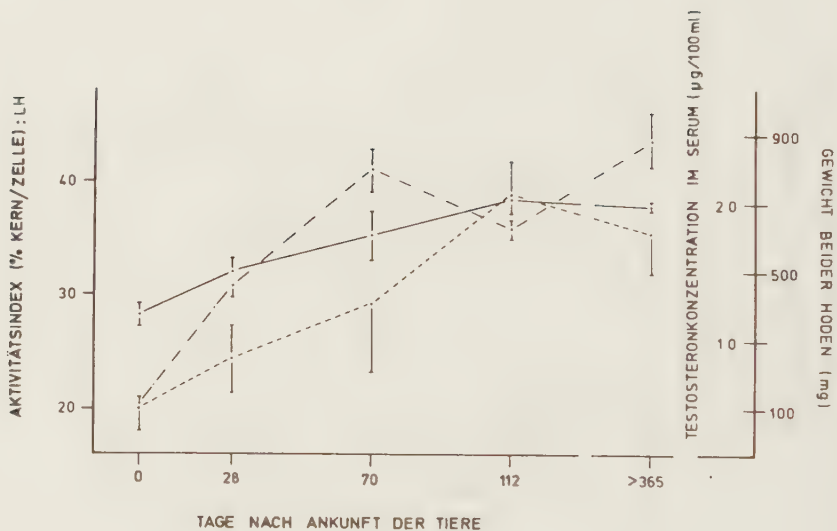


Abb. 3. Aktivität der LH-bildenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (—) männlicher Tupajas im Verlauf ihrer Eingewöhnung und ihre Beziehung zum Hodengewicht (----) und der Testosteronkonzentration (-·-·-) im Blut. Einzelheiten siehe Abb. 1.

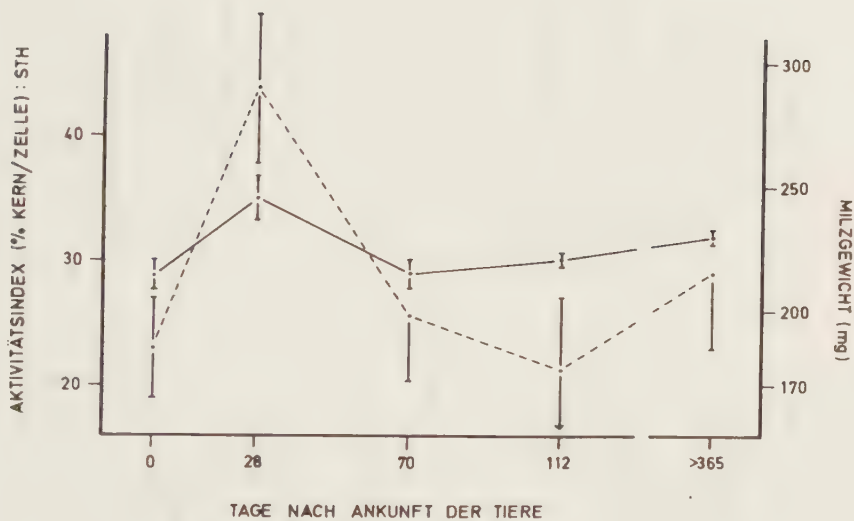


Abb. 4. Aktivität der STH-bildenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (—) männlicher Tupajas im Verlauf ihrer Eingewöhnung und ihre Beziehung zum Milzgewicht der Tiere (----). Einzelheiten siehe Abb. 1.

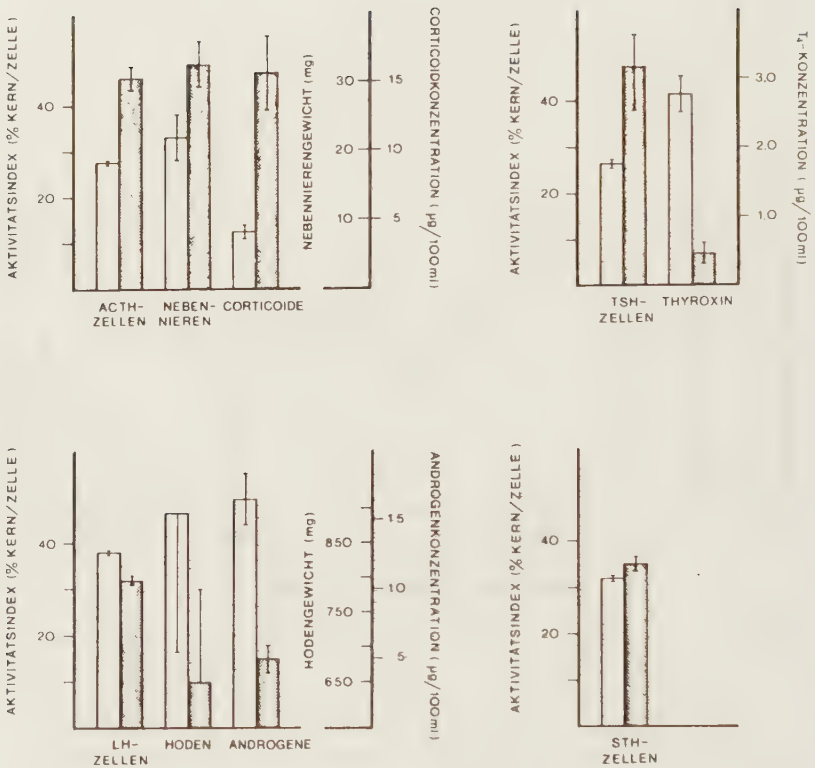


Abb. 5. Aktivität der Hypophysenvorderlappenzellen männlicher Tupajas im Verlauf ihrer Eingewöhnungszeit und ihre Beziehung zu den von ihnen beeinflussten Organen und Hormonen bei Kontrolltieren (□) und Tieren unter soziopsychischem Dauerstress (▨). Es sind stets die Mittelwerte mit ihren mittleren Fehlern angegeben. Aktivitätsindices: 180 Werte von 6 Tieren; die übrigen Werte stammen von jeweils 6 Tieren.

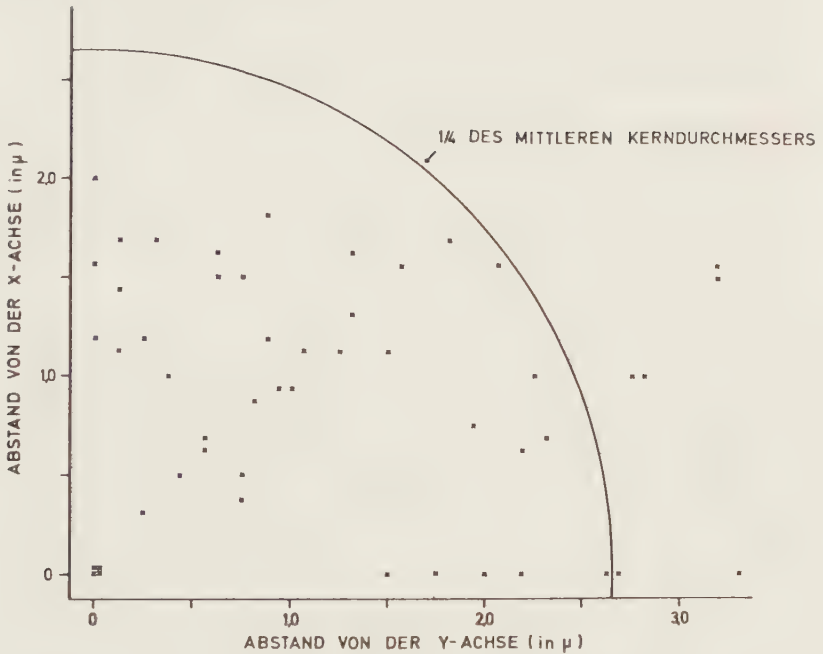


Abb. 6. Entfernung des Kernmittelpunktes vom Mittelpunkt der Zelle. Es wurde die Entfernung der x-Achse des Kerns von der x-Achse der Zelle und die Entfernung der y-Achse des Kerns von der y-Achse der Zelle bestimmt. In ein Koordinatensystem wurden die Entfernungen der Schnittpunkte dieser beiden zueinander stehenden Kerndurchmesser vom Schnittpunkt der beiden zueinander senkrecht stehenden Zelldurchmesser eingetragen. Alle Zellen ($n = 49$) auf der Photographie eines Schnittes wurden ausgewertet.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Hypophysenvorderlappen adulter männlicher Tupajas wurden immunhistologisch die Zellen lokalisiert, die die Hormone ACTH, TSH, und STH bilden und ihr Aktivitätsindex (= prozentualer Anteil des Kerns pro Zelle) bestimmt.

2. Dieser Aktivitätsindex wurde am 1., 28., 70. und 112. Tag nach Ankunft der Tiere aus Thailand gemessen; außerdem wurde er bei Tupajas bestimmt, die länger als ein Jahr im Institut gehalten worden waren und bei Tieren, die 4 Tage sozialem Dauerstress (= Anblick des siegreichen Artgenossen) ausgesetzt waren.

3. Der Aktivitätsindex der ACTH-produzierenden Zellen ist am 1. und 28. Tag etwa gleich, am 70. Tag beträchtlich erniedrigt und bleibt von da an auf etwa demselben Niveau. Er ist mit dem Gewicht beider Nebennieren positiv, mit der Corticoidkonzentration im Blut negativ korreliert (Tab. 2, Abb. 1). Unter sozialem Dauerstress steigt der Aktivitätsindex an und ist mit dem Gewicht der Nebennieren und der Corticoidkonzentration im Blut der Tiere positiv korreliert (Tab. 3, Abb. 5).

4. Der Aktivitätsindex der TSH-produzierenden Zellen nimmt während der Eingewöhnungszeit ab, die Thyroxinkonzentration dagegen zu (Tab. 2, Abb. 2). Unter sozialem Dauerstress nimmt der Aktivitätsindex zu, die Thyroxinkonzentration ab (Tab. 3, Abb. 5).

5. Der Aktivitätsindex der LH-produzierenden Zellen nimmt während der Eingewöhnungszeit zu und ist am 112. Tag und nach einem Jahr etwa gleich; er ist mit dem Gewicht der Hoden und der Testosteronkonzentration im Blut der Tiere positiv korreliert (Tab. 2, Abb. 3). Unter sozialem Dauerstress nehmen der Aktivitätsindex, das Gewicht der Hoden und die Testosteronkonzentration im Blut der Tiere ab (Tab. 3, Abb. 5).

6. Der Aktivitätsindex der STH-produzierenden Zellen ist am 28. Tag beträchtlich erhöht, zu allen anderen Zeitpunkten ist er etwa gleich. Er ist mit dem Gewicht der Milz korreliert (Tab. 2, Abb. 4). Unter sozialem Dauerstress ist der Aktivitätsindex leicht erhöht (Abb. 5).

7. Der Aktivitätsindex als ein Maß für die Aktivität der Hypophysenvorderlappenzellen und seine Beziehung zu peripheren Parametern wird diskutiert.

G. LITERATUR

- Allanson, M., Cameron, E., Forster, C.L.: Observations on the acidophil cells of the adenohypophysis in pregnant and lactating rabbits. *J. Reprod. Fert.* 12, 319-326 (1966)
- Anderson, L.L., Peters, J.B., Melampy, R.M., Cox, D.F.: Changes in adenohypophysial cells and levels of somatotropin and prolactin at different reproductive stages in the pig. *J. Reprod. Fert.* 28, 55-65 (1972)
- Arnold, M., Klessen, Ch.: Informationswert histochemischer Untersuchungen. *Acta Histochem. Suppl.* XIV, 79-90 (1975)
- Bajusz, E.: The pituitary-adrenocortical system, its regulation and adaptive functions. In: *Physiology and pathology of adaptation mechanisms* (ed. E. Bajusz), p. 89-145. Pergamon Press: Oxford-London-New York 1969
- Berendes, H.D.: Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. *Chromosoma (Berl.)* 17, 35-77 (1965)
- Breustedt, H.-J.: Zur immunhistologischen ACTH-Lokalisation in der Rattenhypophyse. *Endokrinologie* 53, 1-19 (1968)
- Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.: *Methods in immunology*. W.A. Benjamin, Inc.: New York-Amsterdam 1964
- Dallman, M.F., Jones, M.T., Vernikos-Danellis, J., Ganong, W.F.: Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: rapid effects of bilateral adrenalectomy on plasma ACTH in the rat. *Endocrinology* 91, 961-968 (1972)

Dedmon, R.E., Holmes, A.W., Deinhardt, F.: Preparation of fluorescein-isothiocynatelabeled γ -globulin by dialysis, gel filtration and ion-exchange chromatography in combination.

J. Bact. 89, 734-739 (1965)

El Etreby, M.F., Günzel, P., Wrobel, K.-H.: Cytologische und immun-enzymcytochemische Studien am Hypophysenvorderlappen der Beagle-Hündin während verschiedener Reproduktionsphasen.

Endokrinologie 64, 129-146 (1975)

Elftman, H.: A chrome-alum fixative for the pituitary.

Stain Technol. 32, 25-28 (1957)

Evans, C.S., Barnett, S.A.: Physiological effects of "social stress" in wild rats: 3. Thyroid.

Neuroendocrinology 1, 113-120 (1965/66)

Farquar, M.G.: Processing of secretory products by cells of the anterior pituitary gland.

Mem. Soc. Endocrinol. 19, 79-124 (1971)

Farquar, M.G., Rinehart, J.F.: Cytologic alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: An electron microscope study.

Endocrinology 55, 857-876 (1954)

Foster, C.L.: Relationship between ultrastructure and function in the adenohipophysis of the rabbit.

Mem. Soc. Endocrinol. 19, 125-146 (1971)

Goldstein, G., Slizys, I.S., Chase, M.W.: Studies on fluorescent antibody staining. I. Non spezific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globulins.

J. exper. Med. 114, 89-109 (1961)

- Goldstein, G., Spalding, B.H., Hunt jr., W.B.: Studies on fluorescent antibody staining. II. Inhibition by sub-optimally conjugated anti-body globuline.
Proc. Soc. exper. Biol. Med. 11, 416-432 (1962)
- Herrmann, M., Lautenschläger, J.: Auswirkung langfristiger Metyrapon-Zufuhr auf das Zellkernvolumen von Nebennierenrinde, Schilddrüse und Leber des Meerschweinchens.
Arzneimittel-Forsch. 18, 1463-1465 (1968)
- Holst, D.v.: Renal failure as the cause of death in tupaia belangeri exposed to persistent social stress.
J. comp. Physiol. 78, 236-273 (1972)
- Kanno, T.: Relation between amylase release and changes in electrophysiological and morphological properties of cells in the exocrine pancreas. In: Secretory mechanisms of exocrine glands (eds. N.A.Thorn, O.H.Petersen), p. 278-295.
Munksgaard: Copenhagen 1974
- Kirkmen, H.: A cytological study of the anterior hypophysis of the guinea pig and a statistical analysis of its cell types.
Amer. J. Anat. 61, 223-279 (1931)
- Kracht, J., Hachmeister, U., Breustedt, H.-J., Zimmermann H.-D.: Immunhistologische Hormonlokalisation im Hypophysenvorderlappen des Menschen.
Mat. Med. Nordmark 19, 224-238 (1967)
- Ludwig, K.S.: Das Zellkernvolumen in der Schilddrüse normaler sowie Thiouracil und Thyroxin behandelter Ratten.
Acta Anat. 11, 146-161 (1950)
- Malendowicz, L.K.: Comparative studies on the effect of aminogluthimide, metopirone, ACTH and hydrocortisone on the adrenal cortex of adult male rats. I. Karyometrical investigations.
Virchows Arch. Abt. B Zell Path. 11, 55-56 (1972)

- Mason, J.W., Mougey, E.H., Brady, J.V., Tolliver, G.A.: Thyroid (plasma butanol-extractable iodine) responses to 72-hr. avoidance sessions in the monkey.
Psychosom. Med. 30, 682-695 (1968)
- McCullagh, E.P.: Cushing's syndrome. In: The human adrenal cortex (ed. A.R.Currie), p. 407-424.
Livingstone: Edinburg, London 1962
- Mirecka, J., Pearse, A.G.E.: Localization of FSH- and LH-producing cells in the pig adenohypophysis by an immunohistochemical technique.
Folia Histochem. Cytochem. 9, 365-372 (1971)
- Face, N., Schaffer, F.L., Elmadjian, F., Minard, D., Davis, S.W., Kulbuck, J.D., Walker, E.L., Johnston, M.E., Zilinsky, A., Gerard, R.W., Forsham, P.H., Taylor, J.G.: Physiological studies on infantrymen in combat.
Univ. Calif. Publ. Physiol. 10, 1-47 (1956)
- Palkovits, M.: Quantitativ-histologische Methoden in Verbindung mit der Schilddrüse und ihre vergleichende Bewertung.
Endokrinologie 45, 227-247 (1963)
- Perret, M.: Variations of endocrine glands in the lesser mouse lemur, *Microcebus murinus*. In: Prosimian biology (eds. R.D.Martin, G.A. Doyle, A.C. Walker), p. 375-388.
Duckworth: Gloucester 1975
- Rinderknecht, H.: Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins.
Nature (Lond.) 193, 167-176 (1962)
- Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J.: Hypothalamic regulatory hormones.
Science 179, 341-350 (1973)

Selye, H.: The physiology and pathology of exposure to stress.

Acta: Montreal 1950

Serber, B.S.: Large nuclear inclusions in the pituitary gland basophils of the golden hamster.

Anat. Rec. 139, 345-356 (1961)

Sharaway, M., Penney, D.P.: Effect of corticotropin, steroidogenic inhibitors and hypophysectomy on the nuclear volumes of fasciculata cells in the rat adrenal cortex.

Acta Anat. 98, 420-426 (1977)

Stark, E., Palkovitz, M., Facht, J., Hajtman, B.: Adrenocortical nuclear volume and adrenocortical function.

Acta Med. Hung. 21, 263-269 (1968)

Vescei, P., Caslay, L.: Vergleichende Untersuchungen über die Corticosteroidbildung und das morphologische Verhalten der Nebennieren bei chronischen Reizen ausgesetzten Tieren.

Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. 14, 57-65 (1965)

Weidner, W.: Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation von STH und LTH im Hypophysenvorderlappen verschiedener Spezies.

Beitr. Path. 145, 168-203 (1972)

Winckler, G.K.: Phasisches Verhalten der Nebennierenfunktion sowie verschiedener Stoffwechselfartner nach einmaliger ACTH- oder Corticosteroidgabe beim Menschen.

Ulm: Habilitationsschrift der klin. med. Fakultät 1970

LEBENS LAUF

Ich wurde am 12. August 1948 in Bruckmühl als Sohn des Landwirts Hans Kolb und seiner Frau Frieda, geb. Schubert, geboren. Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich das Humanistische Gymnasium in Tegernsee und ab Herbst 1964 das Ludwigsgymnasium in München, wo ich im Sommer 1968 das Abitur machte. Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München das Studium der Biologie, das ich am 15. September 1975 mit dem Diplom abschloß. Ende 1975 begann ich mit meiner Dissertation.

